

機関番号：13901

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18075004

研究課題名（和文）花粉管ガイダンスと重複受精におけるゲノム障壁の鍵因子

研究課題名（英文）Key molecules for the genome barrier of pollen tube guidance and double fertilization

研究代表者 東山 哲也 (HIGASHIYAMA TETSUYA)

名古屋大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：00313205

## 研究成果の概要（和文）：

トレンニア *in vitro* 重複受精系およびそれを応用したシロイヌナズナ *in vitro* 重複受精系、また様々な顕微操作技術を駆使することにより、花粉管ガイダンスおよび重複受精過程におけるゲノム障壁の鍵因子を同定することを目指した。特に、助細胞が分泌する花粉管誘引物質、花粉管が誘引物質に応答できるように受精能獲得を促す母体因子 AMOR、そして重複受精の動態ならびに重複受精に関与する因子に着目した。その結果、140 年以上に渡って探索されてきた花粉管誘引物質を、助細胞が分泌する複数のペプチド LURE として同定し、LURE がゲノム障壁を特徴づけるような極めて動的な分子進化を示すことを解明した。また、AMOR の精製を進め、組織ならびに種特異的に強い活性を示す糖鎖の関与を示すことができた。さらに、重複受精を初めてライブイメージングにより捉えることに成功し、世界的な重複受精研究の進展を先導することができた。同時に、重複受精過程に異常を示す突然変異体を複数見出すことに成功し、今後の植物受精研究の重要な研究基盤を構築することに成功した。

## 研究成果の概要（英文）：

Here I aimed to study the genome barrier in pollen tube guidance and double fertilization, by using the *in vitro* *Torenia* and *Arabidopsis* systems and our many micromanipulation techniques. I focused on pollen tube attractants derived from the synergid cell, an ovular factor AMOR that makes pollen tubes growing through the cut style competent to be attracted to the embryo sac, and dynamics of two sperm cells and molecular mechanism for double fertilization. I discovered attractant peptide LUREs that was derived from the synergid cell, which had been searched for more than 140 years. LUREs showed rapid and drastic molecular evolution consistent with that these were critical factors for reproductive isolation. AMOR was shown to be related to sugar chains specific to ovule tissues and species. Double fertilization was directly observed for the first time in the living material, whereby we could contribute to advances of this field. Visualization of double fertilization was also useful to get various mutants defective in double fertilization, which would be a significant basis for further study of the molecular mechanism of double fertilization.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	19,200,000	0	19,200,000
2007年度	19,200,000	0	19,200,000
2008年度	19,200,000	0	19,200,000
2009年度	27,200,000	0	27,200,000
2010年度	11,500,000	0	11,500,000
総計	96,300,000	0	96,300,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：植物、花粉管ガイダンス、重複受精、細胞間シグナリング、顕微細胞操作

### 1. 研究開始当初の背景

高等植物の卵細胞は、助細胞や中央細胞とともに胚嚢 ( $n$  世代; 雌性配偶体) を形成し、母体 ( $2n$  世代; 孢子体) の胚珠組織に埋め込まれている。このため、花の中で花粉管 ( $n$  世代; 雄性配偶体) が胚嚢に到達し重複受精が行われる過程を生理生化学的に解析することは極めて難しい。申請者は、世界に先駆けて胚嚢が裸出するトレニア (*Torenia fournieri*) の *in vitro* 重複受精系やレーザーによる顕微細胞操作技術を開発してきた。こうした実験系や技術を用いることで、植物生殖過程でも特に多くの生殖的隔離障壁の存在が示唆される、花粉管ガイダンスおよび重複受精過程の分子機構の解明が期待される。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、研究代表者が独自に開発してきた実験系および技術を駆使して、花粉管ガイダンスおよび重複受精過程においてゲノム障壁の鍵因子となる、細胞間シグナリング分子を同定することである。

このために、以下の I~III の 3 つの解析を進める。I) 助細胞が分泌する花粉管誘引物質の同定: 100 年以上に渡る解析にも関わらず存在すら不明だった花粉管の誘引物質について、我々はそれが確かに存在し、しかも卵細胞の隣にある 2 つの助細胞から分泌されていることをつきとめた。この物質には強い種の特異性がある。この物質を同定することで、花粉管ガイダンスの分子機構を解明し、ゲノム障壁の打破も試みる。II) 花粉管の受精能獲得を制御する母体因子の同定: 我々は花粉管にも「受精能獲得」に似た機構が存在し、母体組織による多段階のコントロールで花粉管が誘引シグナルに対する応答能力を獲得することを発見した。その後他の植物でもこの機構が示唆される一方、我々は最終段階で糖鎖の関与が示唆される AMOR (活性に種の特異性あり) がシグナリング物質として働くことを明らかにした。物質の精製により、この遺伝子を同定するとともに、母体による花粉管受精能の獲得制御の全容を分子レベルで解明する。III) ライブイメージング解析による雌雄細胞間シグナリング分子の探索: これらの分子の解析に加え、これまで準備を進めてきた、蛍光プローブやライブイメージング技術を用いて、シロイヌナズナのビジブルスクリーニングをはじめとした、新たな細胞間シグナリング分子の探索も行う。

### 3. 研究の方法

助細胞由来する花粉管誘引物質を探索するために、トレニア助細胞を酵素処理により顕微鏡下で回収し、25 細胞を用いて cDNA ライブラリーを作製した。このライブラリーを用いて、サンガー法により EST 解析を進めた。約 2000 クローンの cDNA について両側からシーケンシングし、約 4000 の EST を得た。これをもとに誘引物質の候補タンパク質を探索し、局在解析、組換えペプチドを用いた誘引活性の解析、マイクロインジェクションによる発現阻害実験により、候補タンパク質が花粉管誘引物質であるか否か解析を進めた。またさらに、トレニアの情報をもとに、ゲノムワイドな解析から、シロイヌナズナの花粉管誘引物質を探索し、誘引物質の分子進化について分子系統解析を進めた。

受精能獲得の分子機構を明らかにするために、トレニア *in vitro* 重複受精系をもとにした AMOR アッセイ系を開発し、AMOR 分子の特徴付けを進めた。また、AMOR の同定に向けて、各種カラムを用いて AMOR の生成を目指した。

重複受精を可視化するために、雌雄の全配偶体細胞を十分に可視化するマーカーラインを整備した。また、重複受精を可視化するために、2 色同時に高速で 3D 画像を取得し、タイムラプス解析を行うための、デュアルカラー共焦点レーザー顕微鏡を整備し、これにより重複受精過程のライブイメージング解析を進めた。さらに、各種マーカーラインを T-DNA 挿入ならびに重イオンビーム照射などにより変異処理し、受精過程に異常のある突然変異体の探索および解析を進めた。

### 4. 研究成果

トレニア助細胞の EST 解析により、256 の contig を得た。驚いたことに、全 EST の 24% を分泌性でシステインに富む低分子量タンパク質 (cysteine-rich peptides; CRPs) が占めることが明らかとなった。EST リード数で上位 8 つの contig のうち、7 つが CRPs であった。全部で 16 の CRP 遺伝子を見出し、上から *TfCRP1*, *TfCRP2*, ... のように名付けた。さらに、リード数にして 200 を超える上位 3 つの CRPs について、集中して解析を進めた。これらは CRPs の中でも、特にディフェンシンに類似した構造を示した。TfCRP1 および 3 はシステインの配列や数 (6)、アミノ酸の数 (~70)、全体的な相対性 (similarity, 62%) においても互いに類似していた。これに対し、TfCRP2 は、システインの数は 8 つで、全体が 48 アミノ酸と

短かった。また RT-PCR で *TfCRP1* および *3* は助細胞だけで強く発現するのに対し、*TfCRP2* は葯や受精後の果実でも発現が見られた。*TfCRP1* および *3* は、ウェスタンブロットでそれぞれ成熟した未授精の子房特異的に、8.6 kD および 9.8 kD のサイズで単一のバンドとして検出された。これらは、予想されるクレベッジサイト以降のペプチドを大腸菌で得た場合と同じ大きさである。また、免疫染色により、両者はそれぞれ助細胞基部にある線形装置という細胞壁構造の表面に分泌されていた。この部位は、花粉管が誘引される部位である。

さらに、*in vitro* アッセイ系により、組換えタンパク質に誘引活性があるか調べた。独自に開発したゼラチンビーズ法で解析を進めたところ、*TfCRP1* および *3* ともに、濃度依存的に活性を示すことが明らかとなった。至適濃度では、およそ 50~60% の花粉管が誘引され、これは胚嚢を直接花粉管の前に置いた時と同様の頻度である。*TfCRP1* および *3* ともに、培地上で発芽し受精能をもたない花粉管や、近縁のアゼトウガラシの花粉管には全く作用を示さず、これらはトレニアの助細胞が示す誘引活性と同様である。こうした結果から、*TfCRP1* および *3* は助細胞に由来する花粉管誘引物質と考えられ、それぞれ *LURE1* および *2* と名付けた。化学合成した *TfCRP2* には誘引活性は認められていない。また、独自のレーザーマイクロインジェクション法により *LURE1* および *2* をモルフォリノアンチセンスオリゴで下方制御することを試みた結果、アンチセンス特異的に花粉管の誘引が阻害されることが示された。以上の結果から、*LURE1* および *2* が、真の花粉管誘引物質であることを明らかにした。

次に、シロイヌナズナにおいて、ゲノム上に存在する 825 個の *CRP* 遺伝子の中から見出したディフェンシン類似の重複遺伝子群 (*CRP810\_1.1~1.6*) について、誘引物質をコードすることを証明した。RNAi により、*CRP810\_1* が免疫染色で検出されない程度までノックダウンしたところ、複数のラインにおいて、およそ 10% 程度の胚珠で花粉管の走性異常が見られた。花粉管が珠柄をのぼった後、珠孔になかなか入れず迷走したり、珠孔に入れないような表現型を示した。胚珠の花粉管誘引能力が低下していることが考えられたので、*in vitro* で野生型の胚珠と並べて置いた。その結果、ほとんどの花粉管は野生型の胚珠に誘引され、*CRP810\_1* のノックダウンで確かに誘引活性が低下していることが確認された。*CRP810\_1* ペプチドはシロイヌナズナの花粉管特異的に誘引活性を示すことから、これらが花粉管誘引物質であることが示された。これらを、*AtLURE1* と名付けた (*CRP810\_1.1~1.6=AtLURE1.1*

~1.6)。なお、*CRP810\_1.5* は Col-0 系統ではシステインの 1 つが他のアミノ酸に置換されていて誘引活性を示さないが、システインに復帰することで誘引活性を示すようになった。

さらに、*AtLURE1* は動的な分子進化を示すことが明らかとなった。名古屋大学の石黒研究室からシロイヌナズナの他のエコタイプの種子をいただき、12 系統において *AtLURE1.1~1.6* のセットをクローニングすることができた。その結果、複数のエコタイプにおいて、機能欠損を引き起こす可能性のある様々な突然変異が見られた。*AtLURE1* が重複遺伝子群であるため、個々の遺伝子の変化が許容されているものと考えられる。さらに、近縁種である *A. lyrata* の *AtLURE1* ホモログをデータベース上で見出し、シクエンス解析を行った。その結果、*AtLURE1* 遺伝子と *ALURE1* 遺伝子は、共通の祖先遺伝子がゲノム上の異なる位置で重複したことが示唆された。分子系統解析からも、*AtLURE1* はシロイヌナズナの 317 個のディフェンシンにおいて、もっとも最近重複した遺伝子群の 1 つであることが示唆され、同様の重複を示すのは病原応答に関わる *PDF1* 遺伝子だけであった。このような動的な分子進化は、*LURE* 遺伝子がまさにゲノム障壁の鍵因子であることを示唆している。

トレニア属近縁種においても *LURE* 遺伝子の同定に成功しており、トレニアおよびシロイヌナズナ、さらにそれらの近縁種の複数の *LURE* 遺伝子を操作することで、ゲノム障壁の打破が可能になると考えている。また、トレニアの *LURE2* (*TfLURE2*) を活性のある状態で Alexa 蛍光ラベルすることにも成功し、*in vitro* 系における *LURE* の動態をリアルタイムで解析することを可能にした。

次に、花粉管に受精能を与える母体因子 AMOR については、安定した顕微アッセイ系を構築することができた。その結果、AMOR 活性は、弱いながらも、ダイコンの根から得られた精製 AGP や、ヤリブ精製したアラビアゴムなどでも見られた。しかしながら、濃度を検討しても最も高頻度で花粉管を活性化できるのは同植物種の胚珠培養液であった。このことから、AMOR は比較的類似の物質が植物に広く存在するものの、特異的な構造を示すものが同種の胚珠に存在するものと予想される。脱塩カラム、イオン交換カラム、レクチンカラムを用いた精製により、AMOR 濃度は向上し、精製が進んでいることがうかがえるが、高活性画分においてタンパク質は今のところ検出されていない。このことから AMOR が糖そのものである可能性も視野にいれ、さらに解析を進めている。

さらに、シロイヌナズナを用いて重複受精についてライブイメージング解析を進めた。

精細胞特異的ヒストン遺伝子の *HTR10*、配偶体細胞の全てを標識できるリボソーム遺伝子 *RPS5A*、また卵細胞特異的な *DD45* 遺伝子(東京大学の堤研究室において作製)といった、優れたマーカー遺伝子をもとにした蛍光タンパク質マーカーを整備することができた。これに前述の顕微鏡システムの構築や、安定した *in vitro* 重複受精を実現することで、重複受精過程を 30 秒もしくは 1 分間隔といった従来に比べて飛躍的に高い時間分解能で撮影することに成功した。精細胞の放出過程など、特に動きの速い過程については、タイムラプスではない連続観察で解析することに成功した。

その結果、植物の鞭毛のない精細胞は、花粉管から放出された勢いそのまま、卵細胞と中央細胞の間の、重複受精の起こる狭い領域に平均 8.8±5.5 秒で 2 つ揃って到達することが明らかとなった。シロイヌナズナにおいても、以前トレンニアで観察されたように、花粉管の内容物放出ともなって 2 つの助細胞のうち 1 つが瞬間的に崩壊することが示された。2 つの精細胞は、その受精が起こる領域に平均 7.4±3.3 分とどまったのちに、卵細胞および中央細胞と受精することが示された。卵細胞と中央細胞で受精の順番は決まっておらず、両者の受精の時間差は、平均 2.5±1.7 分であった。両者の受精がほぼ同時に起こる例も観察され、動物のように速い多精拒否機構の存在も示唆される。2 つの精細胞は、明確な発生軸に沿って花粉管の中に前後に並ぶよう発生する。これらはその位置に応じて受精相手があらかじめ決まっているとする説が存在した。しかしながら、Kikume Green Red 蛍光タンパク質をマーカーとしてラベルした 2 つの精細胞の一方を、UV スポット光で光変換して異なる色で標識したところ、前後の精細胞は、それぞれ卵細胞とも中央細胞とも受精することが示された。こうして明らかになった真の精細胞の挙動は、重複受精の分子機構を解明していく上で極めて重要である。

こうした配偶体細胞の可視化技術を使った可視スクリーニングにより、重複受精過程に異常のある変異体を複数得ることに成功した。例えば、精細胞が分裂できず 1 つのまま胚嚢に放出される *g21* 変異体では、受精が起こらないことが示された。興味深いことに、*in vitro* 重複受精系において、*g21* の花粉管で受精が失敗したあとに、2 つ目の助細胞が 2 本目の花粉管として野生型の花粉管を受け取って、重複受精が遂行される場合があることが示された。2 つ目の助細胞も、受精を行わせる機能があることがわかる。このように得られた複数の突然変異体を用いて解析していくことで、重複受精の新たなメカニズムや、分子機構の解明につながることを期待さ

れ、同時に重複受精過程におけるゲノム障壁の理解も進むことが期待される。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 31 件)

- ① Nao Kawano, Daichi Susaki, Narie Sasaki, Tetsuya Higashiyama. Isolation of gametophytic cells and identification of their cell-specific markers in *Torenia*, *T. concolor* and *L. micrantha*. *Cytologia*. 査読有. 2011. 印刷中
- ② Knaoka M M, Kawano N, Matsubara Y, 7 名中 7 番目. Identification and Characterization of TcCRP1, a Pollen Tube Attractant from *Torenia concolor*. *Annals of Botany*. 査読有. 2011. 印刷中
- ③ Yuki Hamamura, Chieko Saito, Chie Awai, 以下省略 8 名 11 番目. Live-Cell Imaging Reveals Dynamics of Two Sperm Cells during Double Fertilization in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology*. 査読有. 21 巻. 2011. 497-502
- ④ Hiroaki Goto, Satoshi Okuda, Akane Mizukami, 以下省略 4 名 7 番目. Chemical Visualization of an Attractant Peptide, LURE. *Plant Cell Physiol*. 査読有. 52 巻. 2011. 49-58
- ⑤ 東山哲也. 花粉管ガイダンス分子 LURE の発見. *Plant Morphology*. 査読無. 22 巻. 2010. 23-31
- ⑥ Tetsuya Higashiyama. Peptide Signaling in Pollen-Pistil Interactions. *Plant Cell Physiol*. 査読有. 51 巻. 2010. 177-189
- ⑦ 東山哲也, 奥田哲弘, 筒井大貴, 以下省略 4 名 1 番目. 花粉管誘引物質ルーアーの発見. 査読無. *化学と生物*. 47 巻. 2009. 617-623
- ⑧ 金岡雅浩, 東山哲也. 花粉管ガイダンス分子の同定と種間と多様性. 査読無. *BLAIN テクニクス*. No 135. 2009. 16-20
- ⑨ 東山哲也. ユニークな植物トレンニアを用いて花粉管誘引物質ルーアーを発見. *細胞工学*. 査読無. 28 巻. 2009. 700-701
- ⑩ Okuda S, Tsutsui H, 以下省略 23 名中 23 番目. Defensin-like polypeptide LUREs are pollen tube attractants secreted from synergid cells. *Nature*. 査読有. 458 巻. 2009. 357-361
- ⑪ 東山哲也. 花のなかでの受精と細胞間シグナリング. 蛋白質核酸酵素. 査読有. 53 巻. 2008. 1267-1274

- ⑫ Berger F, Hamamura Y, Imgouff, M, Higashiyama Tetsuya. Double fertilization -caught in the act. Trends Plant Sci. 査読有. 13 卷. 2008. 437-443
- ⑬ Matsushima R, Hamamura Y, 以下省略 7 名中 3 番目. Mitochondrial dynamics in plant male gametophyte visualized by fluorescent live imaging. Plant Cell Physiol. 査読有. 49 卷. 2008. 1074-1083
- ⑭ Higashiyama T, and Hamamura Y. Gametophytic pollen tube guidance. Sex Plant Reprod. 査読有. 21 卷. 2008. 17-26
- ⑮ Ingouff, M. Hamamura Y, 以下省略 5 名中 4 番目. Distinct dynamics of HISTONE3 variants between the two fertilization products in plants. Curr. Biol. 査読有. 17 卷. 2007. 1032-1037
- ⑯ Higashiyama T, Inatsugi R, 以下省略 10 名中 1 番目. Species specificity of the pollen tube attractant derived from the synergid cell of *Torenia fournieri*. Plant Physiol. 査読有. 142 卷. 2006. 481-491
- ⑰ Nishimura Y, Yoshinari T, Naruse K, 以下省略 8 名中 7 番目. Active digestion of sperm mitochondrial DNA in single living sperm revealed by optical tweezers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 査読有. 103 卷. 2006. 481-491
- ⑱ Mori T, Kuroiwa H, Higashiyama T, and Kuroiwa T. GENERATIVE CELL SPECIFIC 1 is essential for angiosperm fertilization. Nat. Cell Biol. 査読有. 8 卷. 2006. 64-71
- [学会発表] (計 83 件)
- ① 東山哲也. Live Cell Analysis of Pollen Tube Guidance. GOLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCES. 2010/10/26. Suzhou Dushu Lake Conference Center (中国) .
- ② 東山哲也. Pollen tube guidance and peptide attractants in flowering. 2010SDB-JSDB Joint Meeting. 2010/8/8. アルバカーコンベンションセンター(アメリカ) .
- ③ 東山哲也. Live Cell Analysis of Pollen Tube Guidance and Double Fertilization. XXI International Congress on Sexual Plant Reproduction. 2010/8/5. ブリストル大学(イギリス) .
- ④ 東山哲也. Defensin-like polypeptide LUREs are diffusible pollen tube attractants. IPGSA Conference 2010. 2010/6/29. Universitat. Poviral Virgiti Campus (スペイン) .
- ⑤ 笠原竜四郎、浜村有希、東山哲也. Plant fertilization captured by live cell imaging - How do plants two sperm cells two recipient cells? 11th International Symposium on Spermatology. 2010/6/29. 沖縄コンベンションセンター.
- ⑥ 東山哲也. Pollen tube guidance by defensin-like polypeptide LUREs. 第 9 回 IPBM 学会. 2009/10/27. St. Louis America's Center(アメリカ) .
- ⑦ 東山哲也. Identification of pollen tube attractants derived from the synergid cell. Plant Biology 2009(American Society of Plant Biologists). 2009/7/20. ハワイコンベンションセンター(アメリカ) .
- ⑧ Satohiro Okuda, Hiroki Tsutsui, narie Sasaki, Keiko Shiina, Hidenori Takeuchi, Masahiro Kanaoka, Tetsuya Higasiyama. Pollen tube attractants for gametophytic interaction. 第 31 回日本分子生物学会年会. 2008/12/11. 神戸ポートアイランド.
- ⑨ 東山哲也. Pollen Tube Attractants Derived from the Synergid Cell. Frontiers of Sexual Plant Reproduction III. 2008/10/17. アリゾナ大学 (アメリカ)
- ⑩ Yuki Hamamura, Chieko Saitou, Masahiro M Kanaoka, 以下省略 6 名中 6 番目. Real Time Imaging of Double Fertilization in Arabidopsis thaliana. Frontier of Plant Sexual Reproduction III. 2008/10/17. アリゾナ大学(アメリカ)
- ⑪ 東山哲也. Behavior and signaling in gametophytic interactions. FASEB Summer Research Conferences. 2008/8/12. サクストンズリバー(アメリカ) .
- ⑫ 東山哲也. Behavior and signaling in gametophytic interactions. XX International Congress on Sexual Plant Reproduction. 2008/8/5. ブラジリア(ブラジル) .
- ⑬ 東山哲也. 受精のメカニズムをとらえた、公開講演会「かたちと情報から植物の生存戦略を探るー若い世代に向けた植物学への招待ー. 2008/3/22. 札幌.
- ⑭ 東山哲也. 植物の重複受精の謎に挑む～花の中での雌雄の出会い～. 名古屋市立向陽高等学校 先端科学分野講演会. 2007/10/17. 名古屋市立向陽高等学校.

[図書] (計 0 件)  
[産業財産権]

○出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計◇件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

東山哲也・花の中でオスをおびき寄せるための遺伝子・バイオポータル

([http://www.biportal.jp/ja/Column/2009/07/post\\_51.html](http://www.biportal.jp/ja/Column/2009/07/post_51.html))

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東山哲也 (HIGASHIYAMA TETSUYA)

名古屋大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：00313205

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

